

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

NOTIFICATION OF ELECTION

(PCT Rule 61.2)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

Assistant Commissioner for Patents
United States Patent and Trademark
Office
Box PCT
Washington, D.C.20231
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

in its capacity as elected Office

Date of mailing (day/month/year) 29 June 2000 (29.06.00)	
International application No. PCT/JP99/06474	Applicant's or agent's file reference 661637
International filing date (day/month/year) 19 November 1999 (19.11.99)	Priority date (day/month/year) 20 November 1998 (20.11.98)
Applicant UEMURA, Hidetoshi et al	

1. The designated Office is hereby notified of its election made:

☒ in the demand filed with the International Preliminary Examining Authority on:
07 June 2000 (07.06.00)

☐ in a notice effecting later election filed with the International Bureau on:

2. The election ☒ was

☐ was not

made before the expiration of 19 months from the priority date or, where Rule 32 applies, within the time limit under Rule 32.2(b).

<p>The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland</p> <p>Facsimile No.: (41-22) 740.14.35</p>	<p>Authorized officer Antonia Muller</p> <p>Telephone No.: (41-22) 338.83.38</p>
--	--

THIS PAGE BLANK (USPTO)

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference 661637	FOR FURTHER ACTION See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/JP99/06474	International filing date (day/month/year) 19 November 1999 (19.11.99)	Priority date (day/month/year) 20 November 1998 (20.11.98)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC C12N 15/86, 5/10, C12P 21/02		
Applicant FUSO PHARMACEUTICAL INDUSTRIES, LTD.		

1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.
2. This REPORT consists of a total of <u>3</u> sheets, including this cover sheet. <input type="checkbox"/> This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT). These annexes consist of a total of _____ sheets.
3. This report contains indications relating to the following items: I <input checked="" type="checkbox"/> Basis of the report II <input type="checkbox"/> Priority III <input type="checkbox"/> Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability IV <input type="checkbox"/> Lack of unity of invention V <input checked="" type="checkbox"/> Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement VI <input type="checkbox"/> Certain documents cited VII <input type="checkbox"/> Certain defects in the international application VIII <input type="checkbox"/> Certain observations on the international application

Date of submission of the demand 07 June 2000 (07.06.00)	Date of completion of this report 20 February 2001 (20.02.2001)
Name and mailing address of the IPEA/JP	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

THE PAGE BLANK (000000)

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/JP99/06474

I. Basis of the report

1. With regard to the elements of the international application:*

- ☒ the international application as originally filed
- ☐ the description:
pages _____, as originally filed
pages _____, filed with the demand
pages _____, filed with the letter of _____
- ☐ the claims:
pages _____, as originally filed
pages _____, as amended (together with any statement under Article 19
pages _____, filed with the demand
pages _____, filed with the letter of _____
- ☐ the drawings:
pages _____, as originally filed
pages _____, filed with the demand
pages _____, filed with the letter of _____
- ☐ the sequence listing part of the description:
pages _____, as originally filed
pages _____, filed with the demand
pages _____, filed with the letter of _____

2. With regard to the language, all the elements marked above were available or furnished to this Authority in the language in which the international application was filed, unless otherwise indicated under this item.

These elements were available or furnished to this Authority in the following language _____ which is:

- ☐ the language of a translation furnished for the purposes of international search (under Rule 23.1(b)).
- ☐ the language of publication of the international application (under Rule 48.3(b)).
- ☐ the language of the translation furnished for the purposes of international preliminary examination (under Rule 55.2 and/or 55.3).

3. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international preliminary examination was carried out on the basis of the sequence listing:

- ☐ contained in the international application in written form.
- ☒ filed together with the international application in computer readable form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in written form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in computer readable form.
- ☐ The statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished.
- ☒ The statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished.

4. ☐ The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages _____
- ☐ the claims, Nos. _____
- ☐ the drawings, sheets/fig _____

5. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).**

* Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report since they do not contain amendments (Rule 70.16 and 70.17).

** Any replacement sheet containing such amendments must be referred to under item 1 and annexed to this report.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/JP99/06474

V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Claims	1-24	YES
	Claims		NO
Inventive step (IS)	Claims		YES
	Claims	1-24	NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-24	YES
	Claims		NO

2. Citations and explanations

Claims 1-13

Document 1 [Gene, Vol. 162, 1995, pp. 225-229] describes a protein expression vector having a secretion signaling sequence, a Tag sequence, and a cloning site into which a nucleic acid sequence that codes for a target protein can be inserted.

Furthermore, this examination finds that prior to the filing of this application the construction of protein expression vectors for use in mammalian cells was general technical knowledge in the art (for example, JP, 10-179169, A), and therefore persons skilled in the art could easily construct the protein expression vector described in document 1 for use in mammalian cells.

Claim 14-24

Document 1 describes producing proteins from a host that was transformed using a protein expression vector.

THIS PAGE BLANK (USE)

P C T

国際予備審査報告

(法第12条、法施行規則第56条)
〔PCT36条及びPCT規則70〕

REC'D 16 MAR 2001

WIPO

PCT

出願人又は代理人 の書類記号 661637	今後の手続きについては、国際予備審査報告の送付通知（様式PCT/ IPEA/416）を参照すること。	
国際出願番号 PCT/J P 99/06474	国際出願日 (日.月.年) 19.11.99	優先日 (日.月.年) 20.11.98
国際特許分類 (IPC) Int.Cl ¹ C12N 15/86, C12N 5/10, C12P 21/02		
出願人 (氏名又は名称) 扶桑薬品工業株式会社		

- 国際予備審査機関が作成したこの国際予備審査報告を法施行規則第57条（PCT36条）の規定に従い送付する。
- この国際予備審査報告は、この表紙を含めて全部で 3 ページからなる。
☐ この国際予備審査報告には、附属書類、つまり補正されて、この報告の基礎とされた及び/又はこの国際予備審査機関に対してした訂正を含む明細書、請求の範囲及び/又は図面も添付されている。
(PCT規則70.16及びPCT実施細則第607号参照)
この附属書類は、全部で ページである。
- この国際予備審査報告は、次の内容を含む。
 - ☒ 国際予備審査報告の基礎
 - ☐ 優先権
 - ☐ 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての国際予備審査報告の不作成
 - ☐ 発明の単一性の欠如
 - ☒ PCT35条(2)に規定する新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての見解、それを裏付けるための文献及び説明
 - ☐ ある種の引用文献
 - ☐ 国際出願の不備
 - ☐ 国際出願に対する意見

国際予備審査の請求書を受理した日 07.06.00	国際予備審査報告を作成した日 20.02.01	
名称及びあて先 日本国特許庁 (IPEA/J P) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員) 加藤 浩 印 電話番号 03-3581-1101 内線 3448	4 B 9050

THIS PAGE BLANK (USPTO)

I. 国際予備審査報告の基礎

1. この国際予備審査報告は下記の出願書類に基づいて作成された。(法第6条(PCT 14条)の規定に基づく命令に
 応答するために提出された差し替え用紙は、この報告書において「出願時」とし、本報告書には添付しない。
 PCT規則70.16, 70.17)

☒ 出願時の国際出願書類

- ☐ 明細書 第 _____ ページ、 出願時に提出されたもの
 明細書 第 _____ ページ、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
 明細書 第 _____ ページ、 _____ 付の書簡と共に提出されたもの
- ☐ 請求の範囲 第 _____ 項、 出願時に提出されたもの
 請求の範囲 第 _____ 項、 PCT 19条の規定に基づき補正されたもの
 請求の範囲 第 _____ 項、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
 請求の範囲 第 _____ 項、 _____ 付の書簡と共に提出されたもの
- ☐ 図面 第 _____ ページ/図、 出願時に提出されたもの
 図面 第 _____ ページ/図、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
 図面 第 _____ ページ/図、 _____ 付の書簡と共に提出されたもの
- ☐ 明細書の配列表の部分 第 _____ ページ、 出願時に提出されたもの
 明細書の配列表の部分 第 _____ ページ、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
 明細書の配列表の部分 第 _____ ページ、 _____ 付の書簡と共に提出されたもの

2. 上記の出願書類の言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願の言語である。

上記の書類は、下記の言語である _____ 語である。

- ☐ 国際調査のために提出されたPCT規則23.1(b)にいう翻訳文の言語
☐ PCT規則48.3(b)にいう国際公開の言語
☐ 国際予備審査のために提出されたPCT規則55.2または55.3にいう翻訳文の言語

3. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際予備審査報告を行った。

- ☐ この国際出願に含まれる書面による配列表
☒ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表
☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出された書面による配列表
☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表
☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった
☒ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記載した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

4. 補正により、下記の書類が削除された。

- ☐ 明細書 第 _____ ページ
☐ 請求の範囲 第 _____ 項
☐ 図面 図面の第 _____ ページ/図

5. ☐ この国際予備審査報告は、補充欄に示したように、補正が出願時における開示の範囲を越えてされたものと認められるので、その補正がされなかったものとして作成した。(PCT規則70.2(c) この補正を含む差し替え用紙は上記1.における判断の際に考慮しなければならず、本報告に添付する。)

THIS PAGE BLANK (000010)

V. 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての法第12条(PCT35条(2))に定める見解、それを裏付ける文献及び説明

1. 見解

新規性(N)

請求の範囲

1-24

有

請求の範囲

無

進歩性(IS)

請求の範囲

有

請求の範囲

1-24

無

産業上の利用可能性(IA)

請求の範囲

1-24

有

請求の範囲

無

2. 文献及び説明(PCT規則70.7)

請求の範囲1-13

文献1: Gene, 第162巻(1995) p. 225-229

には、分泌シグナル配列、Tag配列、目的タンパク質をコードする核酸配列を挿入することができるクローニング部位を有するタンパク質発現ベクターが記載されている。

そして、哺乳動物細胞用のタンパク質発現ベクターを構築することは、本出願前、周知技術(例えば、JP, 10-179169, A)であったと認められるので、文献1に記載のタンパク質発現ベクターを哺乳動物細胞用のものとして構築することは、当業者が容易になし得ることと認められる。

請求の範囲14-24

文献1には、タンパク質発現ベクターを用いて形質転換した宿主からタンパク質を製造することについても記載されている。

THIS PAGE BLANK (USPTO)

EP

US

国際調査報告

(法8条、法施行規則第40、41条)
[PCT18条、PCT規則43、44]

出願人又は代理人 の書類記号 661637	今後の手続きについては、国際調査報告の送付通知様式(PCT/ISA/220)及び下記5を参照すること。	
国際出願番号 PCT/JP99/06474	国際出願日 (日.月.年) 19.11.99	優先日 (日.月.年) 20.11.98
出願人(氏名又は名称) 扶桑薬品工業株式会社		

国際調査機関が作成したこの国際調査報告を法施行規則第41条(PCT18条)の規定に従い出願人に送付する。
この写しは国際事務局にも送付される。

この国際調査報告は、全部で 2 ページである。

☐ この調査報告に引用された先行技術文献の写しも添付されている。

1. 国際調査報告の基礎

a. 言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願がされたものに基づき国際調査を行った。

☐ この国際調査機関に提出された国際出願の翻訳文に基づき国際調査を行った。

b. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際調査を行った。

☐ この国際出願に含まれる書面による配列表

☒ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表

☐ 出願後に、この国際調査機関に提出された書面による配列表

☐ 出願後に、この国際調査機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表

☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった。

☒ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記載した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

2. ☐ 請求の範囲の一部の調査ができない(第I欄参照)。

3. ☐ 発明の単一性が欠如している(第II欄参照)。

4. 発明の名称は ☒ 出願人が提出したものを承認する。

☐ 次に示すように国際調査機関が作成した。

5. 要約は ☒ 出願人が提出したものを承認する。

☐ 第III欄に示されているように、法施行規則第47条(PCT規則38.2(b))の規定により国際調査機関が作成した。出願人は、この国際調査報告の発送の日から1カ月以内にこの国際調査機関に意見を提出することができる。

6. 要約書とともに公表される図は、
第 _____ 図とする。 ☐ 出願人が示したとおりである。

☒ なし

☐ 出願人は図を示さなかった。

☐ 本図は発明の特徴を一層よく表している。

THIS PAGE BLANK (USPTO)

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ C12N15/86, C12N5/10, C12P21/02

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ C12N15/86, C12N5/10, C12P21/02

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

WPI, WPI/L, BIOSIS PREVIEWS, CAS ONLINE, GenBank/EMBL/DDBJ/Geneseq

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	Sabine K. et al. "The baculovirus expression vector pBSV-8His directs secretion of histidine-tagged proteins" Gene 第162巻 (1995) p. 225-229	1-24
Y	JP, 10-179169, A (株式会社イムノ・ジャパン) 7.7月.1998 (07.07.98) (ファミリーなし)	1-24

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

15.02.00

国際調査報告の発送日

14.03.00

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

加藤 浩

4B

9050

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

THIS PAGE BLANK (USP)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP99/06474

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C12N15/86, C12N5/10, C12P21/02

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C12N15/86, C12N5/10, C12P21/02

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

WPI, WPI/L, BIOSIS PREVIEWS, CAS ONLINE, GenBank/EMBL/DDBJ/Geneseq

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	Sabine K. et al., " The baculovirus expression vector pBSV-8His directs secretion of histidine-tagged proteins" Gene, Vol.162, (1995), p.225-229	1-40
Y	JP, 10-179169, A (Immuno Japan K.K.), 07 July, 1998 (07.07.98) (Family: none)	1-40

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
15 February, 2000 (15.02.00)

Date of mailing of the international search report
14 March, 2000 (14.03.00)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

PCT

世界知的所有権機関
国際事務局
特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(51) 国際特許分類7 C12N 15/86, 5/10, C12P 21/02	A1	(11) 国際公開番号 WO00/31284 (43) 国際公開日 2000年6月2日(02.06.00)		
<table border="0"><tr><td data-bbox="94 394 803 1096" style="vertical-align: top;"><p>(21) 国際出願番号 PCT/JP99/06474</p><p>(22) 国際出願日 1999年11月19日(19.11.99)</p><p>(30) 優先権データ 特願平10/331515 1998年11月20日(20.11.98) JP</p><p>(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 扶桑薬品工業株式会社 (FUSO PHARMACEUTICAL INDUSTRIES, LTD.)[JP/JP] 〒541-0045 大阪府大阪市中央区道修町1丁目7番10号 Osaka, (JP)</p><p>(72) 発明者 ; および</p><p>(75) 発明者 / 出願人 (米国についてのみ) 植村英俊(JEMURA, Hidetoshi)[JP/JP] 〒664-0883 兵庫県伊丹市南鈴原3丁目133 Hyogo, (JP) 奥井 文(OKUI, Akira)[JP/JP] 〒639-1123 奈良県大和郡山市筒井町569-1 コーポ陸603号 Nara, (JP) 小南勝也(KOMINAMI, Katsuya)[JP/JP] 〒599-0212 大阪府阪南市自然田786-2 Osaka, (JP) 山口 希(YAMAGUCHI, Nozomi)[JP/JP] 〒603-8146 京都府京都市北区鞍馬口通り寺町西入ル新御霊口町285-79 Kyoto, (JP)</p></td><td data-bbox="803 394 1513 1096" style="vertical-align: top;"><p>三井真一(MITSUI, Shinichi)[JP/JP] 〒606-8267 京都府京都市左京区北白川西町86 北白川コーポラス202号 Kyoto, (JP)</p><p>(74) 代理人 青山 葆, 外(AOYAMA, Tamotsu et al.) 〒540-0001 大阪府大阪市中央区城見1丁目3番7号 IMPビル 青山特許事務所 Osaka, (JP)</p><p>(81) 指定国 AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW, 欧州特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), ARIPO特許 (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM)</p><p>添付公開書類 国際調査報告書</p></td></tr></table>			<p>(21) 国際出願番号 PCT/JP99/06474</p> <p>(22) 国際出願日 1999年11月19日(19.11.99)</p> <p>(30) 優先権データ 特願平10/331515 1998年11月20日(20.11.98) JP</p> <p>(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 扶桑薬品工業株式会社 (FUSO PHARMACEUTICAL INDUSTRIES, LTD.)[JP/JP] 〒541-0045 大阪府大阪市中央区道修町1丁目7番10号 Osaka, (JP)</p> <p>(72) 発明者 ; および</p> <p>(75) 発明者 / 出願人 (米国についてのみ) 植村英俊(JEMURA, Hidetoshi)[JP/JP] 〒664-0883 兵庫県伊丹市南鈴原3丁目133 Hyogo, (JP) 奥井 文(OKUI, Akira)[JP/JP] 〒639-1123 奈良県大和郡山市筒井町569-1 コーポ陸603号 Nara, (JP) 小南勝也(KOMINAMI, Katsuya)[JP/JP] 〒599-0212 大阪府阪南市自然田786-2 Osaka, (JP) 山口 希(YAMAGUCHI, Nozomi)[JP/JP] 〒603-8146 京都府京都市北区鞍馬口通り寺町西入ル新御霊口町285-79 Kyoto, (JP)</p>	<p>三井真一(MITSUI, Shinichi)[JP/JP] 〒606-8267 京都府京都市左京区北白川西町86 北白川コーポラス202号 Kyoto, (JP)</p> <p>(74) 代理人 青山 葆, 外(AOYAMA, Tamotsu et al.) 〒540-0001 大阪府大阪市中央区城見1丁目3番7号 IMPビル 青山特許事務所 Osaka, (JP)</p> <p>(81) 指定国 AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW, 欧州特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), ARIPO特許 (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM)</p> <p>添付公開書類 国際調査報告書</p>
<p>(21) 国際出願番号 PCT/JP99/06474</p> <p>(22) 国際出願日 1999年11月19日(19.11.99)</p> <p>(30) 優先権データ 特願平10/331515 1998年11月20日(20.11.98) JP</p> <p>(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 扶桑薬品工業株式会社 (FUSO PHARMACEUTICAL INDUSTRIES, LTD.)[JP/JP] 〒541-0045 大阪府大阪市中央区道修町1丁目7番10号 Osaka, (JP)</p> <p>(72) 発明者 ; および</p> <p>(75) 発明者 / 出願人 (米国についてのみ) 植村英俊(JEMURA, Hidetoshi)[JP/JP] 〒664-0883 兵庫県伊丹市南鈴原3丁目133 Hyogo, (JP) 奥井 文(OKUI, Akira)[JP/JP] 〒639-1123 奈良県大和郡山市筒井町569-1 コーポ陸603号 Nara, (JP) 小南勝也(KOMINAMI, Katsuya)[JP/JP] 〒599-0212 大阪府阪南市自然田786-2 Osaka, (JP) 山口 希(YAMAGUCHI, Nozomi)[JP/JP] 〒603-8146 京都府京都市北区鞍馬口通り寺町西入ル新御霊口町285-79 Kyoto, (JP)</p>	<p>三井真一(MITSUI, Shinichi)[JP/JP] 〒606-8267 京都府京都市左京区北白川西町86 北白川コーポラス202号 Kyoto, (JP)</p> <p>(74) 代理人 青山 葆, 外(AOYAMA, Tamotsu et al.) 〒540-0001 大阪府大阪市中央区城見1丁目3番7号 IMPビル 青山特許事務所 Osaka, (JP)</p> <p>(81) 指定国 AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW, 欧州特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), ARIPO特許 (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM)</p> <p>添付公開書類 国際調査報告書</p>			
<p>(54)Title: PROTEIN EXPRESSION VECTOR AND UTILIZATION THEREOF</p> <p>(54)発明の名称 タンパク質発現ベクターとその使用</p> <p>(57) Abstract A protein expression vector characterized by containing a secretory signal nucleic acid sequence and, in the 3'-downstream side thereof, a Tag nucleic acid sequence, a scissile nucleic acid sequence and a cloning site, into which a nucleic sequence encoding a target protein can be inserted, in this order.</p>				

(57)要約

分泌シグナル核酸配列と、その3'下流側に、Tag核酸配列、切断可能核酸配列および目的タンパク質をコードする核酸配列を挿入することができるクロニング部位をこの順序に含んでいることを特徴とする、タンパク質発現ベクター。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

AE	アラブ首長国連邦	DM	ドミニカ	KZ	カザフスタン	RU	ロシア
AL	アルバニア	EE	エストニア	LC	セントルシア	SD	スーダン
AM	アルメニア	ES	スペイン	LI	リヒテンシュタイン	SE	スウェーデン
AT	オーストリア	FI	フィンランド	LK	スリランカ	SG	シンガポール
AU	オーストラリア	FR	フランス	LR	リベリア	SI	スロヴェニア
AZ	アゼルバイジャン	GA	ガボン	LS	レソト	SK	スロヴァキア
BA	ボスニア・ヘルツェゴビナ	GB	英国	LT	リトアニア	SL	シエラ・レオネ
BB	バルバドス	GD	グレナダ	LU	ルクセンブルグ	SN	セネガル
BE	ベルギー	GE	グルジア	LV	ラトヴィア	SZ	スワジランド
BF	ブルキナ・ファソ	GH	ガーナ	MA	モロッコ	TD	チャード
BG	ブルガリア	GM	ガンビア	MC	モナコ	TG	トーゴ
BJ	ベナン	GN	ギニア	MD	モルドヴァ	TJ	タジキスタン
BR	ブラジル	GW	ギニア・ビサウ	MG	マダガスカル	TZ	タンザニア
BY	ベラルーシ	GR	ギリシャ	MK	マケドニア旧ユーゴスラヴィア	TM	トルクメニスタン
CA	カナダ	HR	クロアチア		共和国	TR	トルコ
CF	中央アフリカ	HU	ハンガリー	ML	マリ	TT	トリニダード・トバゴ
CG	コンゴ	ID	インドネシア	MN	モンゴル	UA	ウクライナ
CH	スイス	IE	アイルランド	MR	モリタニア	UG	ウガンダ
CI	コートジボアール	IL	イスラエル	MW	マラウイ	US	米国
CM	カメルーン	IN	インド	MX	メキシコ	UZ	ウズベキスタン
CN	中国	IS	アイスランド	NE	ニジェール	VN	ヴェトナム
CR	コスタ・リカ	IT	イタリア	NL	オランダ	YU	ユーゴスラビア
CU	キューバ	JP	日本	NO	ノルウェー	ZA	南アフリカ共和国
CY	キプロス	KE	ケニア	NZ	ニュージーランド	ZW	ジンバブエ
CZ	チェコ	KG	キルギスタン	PL	ポーランド		
DE	ドイツ	KP	北朝鮮	PT	ポルトガル		
DK	デンマーク	KR	韓国	RO	ルーマニア		

明 細 書

タンパク質発現ベクターとその使用

5 発明の分野

本発明は、タンパク質発現ベクターおよびその使用に関する。より詳しくは、目的とするタンパク質をコードする遺伝子を種々の宿主中で発現させて当該タンパク質を産生することができるタンパク質発現ベクターに関するものであって、当該タンパク質を精製の容易な組換え融合タンパク質の状態が発現させ、細胞外
10 に分泌させることができる点および最終的に目的タンパク質のN末端に余分なアミノ酸が付加しない状態で目的タンパク質を得ることができる点に、技術的特徴と利点を有するものである。

発明の背景

15 組換えタンパク質産生に用いる発現ベクターは、これまでに数多く開発されており、特に大腸菌や酵母等の微生物を宿主とした発現系では、高い収率を期待できるものが提供されるに至っている。生物活性が糖鎖に依存するタンパク質の場合、動物細胞を宿主としてタンパク質を産生させる必要があるが、この点でも、最近、高発現性能を有するベクターが開発され（特開平10-179169号明
20 細書）、これを使用してヒトマンナン結合タンパク質の発現に成功した例がある。

この様に、異種タンパクを産生させるためには、大腸菌、酵母または動物細胞を宿主とする系が多く研究者によって使用されてきた。大腸菌を宿主とする系では、強力な大腸菌由来のプロモーターを用いることにより発現能力を高めることができるが、発現された異種タンパクは細胞内に封入体として集積する場合は
25 ほとんどである。従って、尿素やグアニジンのような変性剤を用いてタンパク質を可溶化した後、活性型のタンパク質への巻き戻しが必要であり、活性型のタンパク質を直接に単離、精製することは極めて困難であって、操作も煩雑になる。

また、酵母を宿主とする系では、プロテアーゼによる分解を回避することができないので、可溶性タンパク質の発現の向上を期待できないばかりでなく、発現

環境が高等動物の細胞内環境と大きくかけ離れているため、タンパク質の修飾が異なる結果となる。さらに、動物細胞を宿主とする系では、天然型とほぼ同等の組換えタンパク質の産生が可能であるが、培養操作が煩雑であり、生産効率の面で難点がある。

5 近年、宿主として昆虫細胞を使用し、バキュウロウィルスにより宿主を感染させる発現系が注目されている。その理由として、バキュウロウィルスは昆虫細胞に感染することにより、全細胞タンパク質の約25%以上をポリヘドロンタンパク質として生産し、この強力なプロモーターを用いて異種タンパク質の高発現系が開発されたことが挙げられる。そして、バキュウロウィルスー昆虫細胞発現系を用いた異種タンパク質の産生については、次のような利点が認められている：

10 (a) 異種タンパク質の発現量が高い；(b) 天然型タンパク質と同様のシグナルペプチドのプロセッシング、糖鎖、リン酸、脂質等による修飾、2量体形成、ウィルス粒子の生成およびイントロンの除去等が起こる；(c) 昆虫細胞内で天然型と同様の細胞内局在性を示す；(d) 昆虫細胞の浮遊培養が可能である。

15 これまで遺伝子操作技術を用いて様々なタンパク質（例えば、インスリン、インターフェロン、エリスロポエチン、マンナン結合タンパク質、コングルチニン等）が昆虫細胞や動物細胞で産生されている。天然型とほぼ同質の組換えタンパク質を得るためには、上記したように、宿主として動物細胞（例えば、哺乳動物細胞または昆虫細胞）を用いる発現系が必須であり、該発現系において有用な発現ベクターの開発が求められている。

20 発現ベクターの開発は、主として組換えタンパク質の発現量を高めることと、発現した組換えタンパク質の精製を簡便にすることの2方面からアプローチされてきた。発現量を高めることを目的としたベクターとしては、例えば特開平10-179169号明細書に開示されたものがあり、精製効率を高めることを目的としたベクターとしては、例えばヒスチジンTagベクター（Invitrogen社製）が知られている。

25 細胞外に分泌した組換えタンパク質の精製を簡便に行うことができるものとして、pSecTagベクター（Invitrogen社製）が市販されている。このベクターは、哺乳動物細胞を宿主とし、分泌シグナル、目的タンパク質をコードする核

酸配列を挿入することができるマルチクローニングサイト、融合タンパク質を認識することができるmycエピトープおよびニッケルキレート樹脂により精製可能なホリヒスチジンTagを含有している。しかしながら、このベクターは、目的タンパク質を昆虫細胞で発現させることはできない。また、動物細胞で発現させることができた場合でも、目的タンパク質のC末端にはmycエピトープ、ヒスチジンTag等のアミノ酸が付加されており、純粋な組換えタンパク質として得ることができない欠点がある。

他方、昆虫細胞で発現させることができ、かつ、精製を容易にすることができるベクターとして、pFastBAC-HTbベクター（GIBCO社製）が市販されている。このベクターは、昆虫細胞を宿主とし、ヒスチジンTag核酸配列、ヒスチジンTag核酸配列と目的タンパク質をコードする核酸配列間の切断可能核酸配列および目的タンパク質をコードする核酸配列を挿入することができるマルチクローニングサイトを有している。しかしながら、このベクターは細胞外に目的タンパク質を分泌させることができる分泌シグナルを含有していない。故に、細胞内に発現した目的タンパク質を得るためには、細胞を破壊する必要がある。細胞を破壊すると、細胞内の無数のタンパク質が漏出し、目的のタンパク質の単離、精製が極めて困難となる。

また、発現され得る組換えタンパク質は、天然のものとアミノ酸配列が同一であることが望ましく、C末端やN末端に発現ベクター由来のアミノ酸が付加していないことが好ましい。特に、天然または組換えタンパク質の1番目（N末端）のアミノ酸の種類は、当該タンパク質の安定性に大きく影響することが知られている。すなわち、N末端のアミノ酸の性質とイン・ビボにおけるタンパク質の寿命との間には強い相関関係があり、これはN末端則（N-end rule）と呼ばれており、細菌から哺乳類に至る調べられた生物すべてについて、多少の差こそあれ、この関係が存在している。

上記したような現状に鑑み、動物細胞、特に哺乳動物細胞または昆虫細胞を宿主とする発現系において、組換えタンパク質を発現し、これを細胞外に分泌することができ、かつ、得られた組換えタンパク質の精製方法が簡便であり、さらには少なくとも天然型と同一であるアミノ酸配列のN末端を有する組換えタンパク

質を発現することができる、発現ベクターの開発が求められていた。

発明の目的

5 従って、本発明の主な目的は、動物細胞、特に哺乳動物細胞または昆虫細胞のような種々の宿主において、組換えタンパク質を発現し、これを細胞外に分泌することができる、かつ、得られた組換えタンパク質の精製方法が簡便であり、さらには少なくとも天然型と同一であるアミノ酸配列のN末端を有する組換えタンパク質を発現することができる、新規な発現ベクターを提供することである。

10 発明の要旨

本発明は、種々の宿主細胞（特に哺乳類細胞や昆虫細胞のような動物細胞）の使用に際して、産生した組換えタンパク質を宿主細胞外に分泌することができ、また産生された組換えタンパク質を容易に精製することができ、更に天然型とほぼ同質である組換えタンパク質を得ることができる、発現ベクターを提供するものである。なお、ここに提供される発現ベクターは、タンパク質に糖鎖の存在が15 不要である場合や基礎的研究のためにタンパク質の生産が行われる場合のように、微生物等を好んで宿主として用いるときにも使用することができる。

本発明にかかるタンパク質発現ベクターは、その基本的構成として、少なくとも（1）分泌シグナル核酸配列と、その3'下流側に（2）T a g核酸配列、20 （3）切断可能核酸配列および（4）目的タンパク質をコードする核酸配列または（4'）目的タンパク質をコードする核酸配列を挿入することができるクローニング部位を、この順序に従って含むものである。なお、これら（1）～（4）または（4'）の必須核酸配列の前後あるいは間に、さらに、エピトープをコードする核酸配列やスペーサー配列をコードする核酸配列のような任意核酸配列を25 適宜に包含させてもよい。

すなわち、本発明は、

（1）分泌シグナル核酸配列と、その3'下流側に、T a g核酸配列、切断可能核酸配列および目的タンパク質をコードする核酸配列を挿入することができるクローニング部位をこの順序に含んでいることを特徴とする、タンパク質発現ベ

クター、

(2) クローニング部位に、目的タンパク質をコードする核酸配列が挿入されている、上記(1)記載のタンパク質発現ベクター、

5 (3) クローニング部位または目的タンパク質をコードする核酸配列が、切断可能核酸配列の3'末端に連続して存在する、上記(1)または(2)記載のタンパク質発現ベクター、

10 (4) 分泌シグナル核酸配列の3'下流側であって、切断可能核酸配列の5'上流側に、少なくとも1個のアミノ酸をコードする核酸配列をスペーサー核酸配列として含んでいる、上記(1)～(3)のいずれかに記載のタンパク質発現ベクター、

(5) スペーサー核酸配列が、少なくともLeu-Val-His-Gly-Lys-Leuなるアミノ酸配列をコードする核酸配列である、上記(4)記載のタンパク質発現ベクター、

15 (6) スペーサー核酸配列が、少なくとも切断可能核酸配列から構成されている、上記(4)または(5)記載のタンパク質発現ベクター、

(7) 切断可能核酸配列がアミノ酸配列に翻訳されたとき、当該アミノ酸配列の上流直近および/または下流直近および/または途中で酵素によって切断される、上記(1)～(6)のいずれかに記載のタンパク質発現ベクター、

20 (8) 切断可能核酸配列が、少なくともAsp-Asp-Asp-Asp-Lysなるアミノ酸配列をコードする核酸配列である、上記(7)記載のタンパク質発現ベクター、

(9) 酵素がエンテロキナーゼである、上記(7)または(8)記載のタンパク質発現ベクター、

(10) 分泌シグナル核酸配列が、IgG(κ)シグナルまたはトリプシンシグナルである、上記(1)～(9)のいずれかに記載のタンパク質発現ベクター、

25 (11) Tag核酸配列がポリヒスチジンである、上記(1)～(10)のいずれかに記載のタンパク質発現ベクター、

(12) さらに抗体認識エピトープをコードする核酸配列を含んでいる、

(1)～(11)のいずれかに記載のタンパク質発現ベクター、

(13) 目的タンパク質をコードする核酸配列がニューロシンをコードするも

のである、上記（１）～（１２）のいずれかに記載のタンパク質発現ベクター、
（１４）上記（１）～（１３）のいずれかに記載のタンパク質発現ベクターで
形質転換された宿主細胞、

（１５）宿主細胞が動物細胞である上記（１４）記載の宿主細胞、

5 （１６）動物細胞が哺乳動物細胞である上記（１５）記載の宿主細胞、

（１７）動物細胞が昆虫細胞である上記（１５）記載の宿主細胞、

（１８）上記（１）～（１８）のいずれかに記載のタンパク質発現ベクターま
たは宿主細胞を用いることを特徴とする、目的タンパク質の製造方法、

（１９）上記（１８）記載の方法によって得られた、目的タンパク質、

10 （２０）上記（１）～（１８）のいずれかに記載のタンパク質発現ベクターま
たは宿主細胞を用いることを特徴とする、目的タンパク質のアミノ酸配列を含む
組換え融合タンパク質の製造方法、

（２１）上記（２０）記載の方法によって得られた、目的タンパク質のアミノ
酸配列を含む組換え融合タンパク質、

15 （２２）上記（２１）記載の組換え融合タンパク質を、当該組換え融合タンパ
ク質中のＴ a g および／またはエピトープを認識できる物質に保持させてから、
脱離させることにより精製し、ここに得られた精製組換え融合タンパク質を、当
該組換え融合タンパク質中の切断可能部位を認識することができる酵素を作用さ
せて、目的タンパク質を遊離させ、その後、この遊離した目的タンパク質を採取
20 することを特徴とする、目的タンパク質の製造方法、

（２３）上記（２１）記載の組換え融合タンパク質を、当該組換え融合タンパ
ク質中のＴ a g および／またはエピトープを認識できる物質に保持させてから、
当該組換え融合タンパク質中の切断可能部位を認識することができる酵素を作用
させて、目的タンパク質を遊離させ、その後、この遊離した目的タンパク質を採
25 取することを特徴とする、目的タンパク質の製造方法、ならびに

（２４）上記（２２）または（２３）記載の方法によって得られた、目的タン
パク質、

を提供するものである。

図面の簡単な説明

図1：実施例1の方法によるプラスミドpTrypHis／ニューロシンの構築図。

図2：実施例1で得られた培養上清と細胞抽出液のウエスタンブロット解析図。

5 図3：実施例2のプラスミドpSecTag／ニューロシン、pSecHisTag／ニューロシンおよびpSecTrypHis／ニューロシンの構築図。

図4：実施例2で得られた培養上清のウエスタンブロット解析図。

図5：実施例3の方法によるプラスミドpFBTrypSigTag／ニューロシンの構築図。

10 図6：実施例3で得られた培養上清のウエスタンブロット解析図。

図7：ニッケルカラムによる組換えヒトニューロシンの精製のゲル電気泳動図。

図8：バキュロウイルス発現系を用いて発現させたヒトニューロシンの酵素活性を表す図。

15 発明の詳細な説明

本明細書で言う「宿主細胞」は、本発明にかかるタンパク質発現ベクター中の目的タンパク質をコードする核酸配列を発現し、これを当該細胞外に分泌することができるものであるならば、その種類を問わない。従って、宿主細胞は、微生物であつてもよいが、好ましくは動物細胞、特に哺乳動物細胞または昆虫細胞である。

20 哺乳動物細胞や昆虫細胞の具体例としては、ヒト由来の細胞、マウス由来の細胞、ハエ由来の細胞、カイコ由来の細胞等を挙げることができ、特にCHO細胞、COS細胞、BHK細胞、Vero細胞、ミエローマ細胞、HEK293細胞、HeLa細胞、Jurkat細胞、マウスL細胞、マウスC127細胞、マウスFM3A細胞、マウス繊維芽細胞、骨芽細胞、軟骨細胞、S2細胞、Sf9細胞、Sf21細胞、High Five（商標）細胞等から選択して使用される。また、微生物としては、大腸菌、酵母菌等が使用され得る。

25 本発明の「タンパク質発現ベクター」は、目的タンパク質を単離、精製もしくは認識しやすいように、組換え融合タンパク質として発現させるものであること

が好ましい。「組換え融合タンパク質」とは、目的タンパク質のN末端側または／およびC末端側に適当なペプチド鎖が付加したタンパク質を意味する。なお、本明細書では、「組換えタンパク質」なる言葉も使用するが、これは目的タンパク質をコードする核酸配列を本発明のタンパク質ベクターに組み込み、発現させて

5 産生した組換え融合タンパク質から、目的タンパク質をコードする核酸配列に由来しないアミノ酸配列を切断、除去したものを言い、実質的に目的タンパク質と同義語である。

本発明のタンパク質発現ベクターによって発現され、細胞外に分泌されたタンパク質は、少なくとも目的タンパク質、T a g 配列およびT a g 配列と目的タン

10 パク質との間に切断可能部位を有するアミノ酸配列から成る組換え融合タンパク質である。また、当該組換え融合タンパク質は、更に抗体が認識することのできるエпитープを含んでいるものであってもよいし、あるいはT a g 配列がエピトープとしての役割を有しているものであってもよい。この様に発現させた組換え融合タンパク質に適当な処理を施すことにより、組換えタンパク質を得ることができる。

15

翻訳後のタンパク質が活性型タンパク質である場合もあるが、そうでない場合でも、これに対して種々のプロセッシングを適用することにより、活性型タンパク質に変換することができる。多くの場合、タンパク質は、まず活性型タンパク質のN末端に15～60個程度のアミノ酸残基から成る分泌に關与するペプチド

20 (分泌シグナル) を付けた不活性前駆体(プロ体)として、細胞質内のリボソーム上で合成される。この分泌シグナルとしてのペプチド部分は、細胞膜を通過する機構に關連しており、膜を通過する際に特異的なプロテアーゼで切断、除去されて(必ずしも常にとは限らないが)、成熟型タンパク質となる。分泌シグナルとしてのペプチド部分は、中央部に疎水性アミノ酸から成る広い疎水性領域を持ち、N末端近くに塩基性アミノ酸残基を有している。なお、分泌シグナルは、シ

25 グナルペプチドと同義語であると理解されてよい。

また、ある種のタンパク質では、不活性前駆体(プロ体)のN末端にさらに分泌シグナルとしてのペプチド部分が結合しており、このようなタンパク質をプレプロタンパク質(プレプロ体)という。例えば、トリプシンは、アミノ酸に翻訳

された直後はプレプロ体として存在し、細胞外に分泌された後はプロ体として存在し、十二指腸でエンテロペプチダーゼもしくはトリプシン自身により限定分解されて、活性型トリプシンとなる。プロ体から活性型タンパク質部分を削除したものをプロ部分と言い、プレプロ体からプロ体部分を削除したものをプレ部分と言
5 言い、プレプロ体から活性型タンパク質部分を削除したものをプレプロ部分と言う。

本発明のタンパク質発現ベクターの必須構成成分の一つである「分泌シグナル核酸配列」とは、分泌シグナルをコードする核酸配列を言う。また、「分泌シグナル」とは、プロ体として発現されるタンパク質においてはプロ部分を指し、プレ
10 プロ体として発現されるタンパク質においては少なくともプレ部分またはプレプロ部分を指すが、細胞内で発現したタンパク質を細胞外に分泌させることができるペプチドであれば特に限定されない。本発明のタンパク質発現ベクター中に構築されている分泌シグナル核酸配列は、分泌シグナルのC末端に切断部位が存在しているものをコードしているのが好ましい。分泌シグナルのC末端に切断部位
15 が存在していないものをコードする場合には、該分泌シグナル核酸配列の3'末端に新たに切断可能部位をコードする核酸配列を挿入するのが好ましい。例えば、配列番号19におけるアミノ酸番号1～23で示すトリプシンシグナルである。該配列のC末端（アミノ酸番号19～23）には、Asp-Asp-Asp-Asp-Lysが存在し、エンテロキナーゼが認識することができる。

20 真核細胞の分泌タンパク質の分泌シグナルは、原核細胞のそれと類似しているため、大腸菌等を宿主として利用してもよい。分泌シグナルは、宿主により細胞外分泌活性が異なるため、宿主に適合した分泌シグナルを選択する必要がある。分泌シグナルの具体例として、IgG (κ)（もしくはIgGk）シグナル（もしくはリーダー）またはトリプシンシグナルを挙げることが出来、これらは宿主
25 細胞として昆虫細胞および哺乳動物細胞を使用した場合、特に高い分泌活性を示す。分泌シグナルの他の具体例としては、ハエ (*Drosophila*) のBiP、ミツバチのメリチン (melittin)、ピチア・パストリス (*Pichia pastoris*) の α -factor、PHO等を挙げることができる。なお、トリプシンシグナルと言う場合、それは配列番号19におけるアミノ酸番号1～18または1～23のいずれで構

成されるものであってもよい。更に、分泌シグナルには、上に例示したもの以外に、それらの同族体や変異体であって、細胞外にタンパク質を分泌させることができるものも含まれる。

5 本発明のタンパク質発現ベクターの他の必須構成成分である「T a g 核酸配列」とは、T a g 配列をコードする核酸配列を言う。「T a g 配列」は、目的タンパク質をコードする核酸に由来しないアミノ酸配列であって、発現させたとき、目的タンパク質の単離、精製および認識を容易にするために組込むものである。従って、T a g 配列は、例えば抗体が認識できる抗原やエピトープであってよい。このようなT a g 配列を有する組換え融合タンパク質を、当該T a g 配列を認識
10 できる物質に保持させることにより、単離、精製を容易に行うことができる。

具体的な単離、精製方法として、例えばT a g 配列を認識できる物質に本発明で得られた組換え融合タンパク質を一旦保持させ、その後脱離させることにより組換え融合タンパク質を得、さらに、これに切断可能配列を認識して切断することができる酵素を作用させることにより、組換えタンパク質を単離、精製する
15 ことができる。また、T a g 配列を認識できる物質に、本発明で得られた組換え融合タンパク質を保持させたまま、脱離行程を経ずに、切断可能配列を認識して切断することができる酵素を作用させることにより、組換えタンパク質を単離、精製することができる。

T a g 核酸配列の具体例としては、ポリヒスチジン（P H I S ; 本明細書中ヒスチジンT a g またはH i s t a g ともいう）、好ましくは6個のヒスチジンから成るもの（（H i s）6）をコードする核酸配列が挙げられる。本発明のタンパク質発現ベクターを用いて、P H I S をコードする核酸配列を発現させた組換え融合タンパク質中には、T a g 配列としてP H I S が存在する。P H I S は、
20 例えばニッケルキレーティング樹脂（ProBond（商標））により吸着され、p H 変動、E D T A もしくはイミダゾール物質添加により当該樹脂から解離することができる。この様な性質を利用することにより、組換え融合タンパク質を単離、精製することができる。

他の例として、グルタチオンSトランスフェラーゼ（G S T）をT a g 配列として使用し、G S T を認識することができるグルタチオンセファロース4 B カラ

ムを用いてアフィニティークロマトグラフィーを行い、その後グルタチオンを加えることによる競合的結合により組換え融合タンパク質を単離、精製することができる。

5 更に他の例として、カルモジュリン結合ペプチド (CBP) を Tag 配列として用い、CBP を認識することができる、カルモジュリンアフィニティー樹脂を用いてアフィニティークロマトグラフィーを行い、その後EGTAを加えることにより組換え融合タンパク質を単離、精製することができる。

10 更に他の例として、プロテインAをTag配列として用い、プロテインAを認識することができるIgGセファロース6FFカラムを使用したアフィニティークロマトグラフィーを行い、その後pH変動等の処理を行うことにより、組換え融合タンパク質を単離、精製することができる。

15 本発明のタンパク質発現ベクターの今一つの必須構成成分である「切断可能核酸配列」とは、当該核酸配列がアミノ酸配列に翻訳された後、当該アミノ酸配列をその上流直近および／または下流直近および／または途中で切断することができるような、核酸配列を言う。

20 例えば、酵素特異的切断が可能なアミノ酸配列をコードする核酸配列がこれに該当し、その具体例として、次のようなものを挙げることができる：アミノ酸配列Asp-Asp-Asp-Asp-Lysをコードする核酸配列（当該アミノ酸配列はエンテロキナーゼによって認識され、そのC末端部分において、組換え融合タンパク質が切断される）；アミノ酸配列Leu-Val-Pro-Arg-Gly-Serをコードする核酸配列（当該アミノ酸配列はトロンビンによって認識され、そのArg-Gly間において、組換え融合タンパク質が切断される）；アミノ酸配列：Ile-Glu-Gly-Argをコードする核酸配列（当該アミノ酸配列はXa因子によって認識され、そのC末端部分において、組換え融合タンパク質が切断される）；アミノ酸配列Glu-Asn-Leu-Tyr-Phe-Glnをコードする核酸配列（当該アミノ酸配列はTEV (Tobacco Etch Virus) プロテアーゼによって認識され、そのC末端部分において、組換え融合タンパク質が切断される）など。

25 なお、切断可能核酸配列は、分泌シグナル核酸配列、Tag核酸配列または目的タンパク質をコードする核酸配列の一部または全部を利用し、これに適宜の核

酸配列を付加するか、または付加することなく、構成するようにしてもよい。

本発明のタンパク質発現ベクターは、上記した三つの必須構成成分に加え、目的タンパク質をコードする核酸配列または当該核酸配列を挿入することができるクローニング部位を、それら必須構成成分の3'下流側に含むものである。目的タン

5 パク質をコードする核酸配列について、特に制限はなく、インスリン、インターフェロン、エリスロポエチン、マンナン結合タンパク質、コングルチニン、ニューロシンなどのタンパク質をコードする核酸配列が使用されてよい。

本発明のタンパク質発現ベクターは、上記必須構成成分が存在していれば、バックボーンベクターはいずれを用いてもよいが、宿主細胞に適合するものを用いるのが好ましい。バックボーンベクターとは、本実施例で言う p S e c T a g 2 A、

10 p S e c T a g 2 B、p F a s t B A C 1 など、原材料となるベクターを言う。バックボーンベクターは、例えばInvitrogen社製の p B A D / H i s、p R S E T A、p c D N A 2. 1、p T r c H i s 2 A、p Y E S 2、p B l u e B a c 4. 5、p c D N A 3. 1 および p S e c T a g 2、Novagen社製の p E T およ

15 び p B A C、Promega社製の p G E M、Stratagene社製の p B l u e s c r i p t II、Pharmacia社製の p G E X および p U C 1 8 / 1 9、Clontech社製の p R T E、p E B F P および p G A D G H 等、タンパク質を発現し得るベクターであれば特に限定されない。

さらに、プロモーターおよび／またはエンハンサーなどは、バックボーンベ

20 ター由来のものを使用してもよいし、宿主に適合するように適宜、置換、付加、削除等を施してもよい。プロモーターまたはエンハンサーとして、例えば T 7、CMV、H S V T K、S V 4 0、R S V、t r c、B A D、T R E / m i n C M V、5' L T R、G A L 1、A O X 1、l a c、A D H 1、Polyhedrin、Metallothionein、Actin 5C gene などを使用することができる。

本発明のタンパク質発現ベクターは、上記必須構成成分に加え、更に「スペーサー核酸配列」を含むことが出来る。スペーサー核酸配列とは、スペーサー配列を

25 コードする核酸配列を言い、本発明のタンパク質発現ベクターのいずれの場所に組み込まれてもよい。スペーサー配列は、分泌シグナル、T a g 配列、エピトープ配列および目的タンパク質のいずれとも異なるアミノ酸配列（通常1～50個

程度のアミノ酸で構成されている)であり、結果的に目的タンパク質を分泌させることができる補助的手段としての役割を果たすものである。

例えば、分泌シグナル、T a g 配列、エピトープ等を酵素などで切断することができる切断可能配列であってよい。特に、目的タンパク質の上流にヒスチジン T a g が存在する場合、分泌シグナルにトリプシンのプレプロ部分を組み込み、プレプロ部分のC末端に連続してアミノ酸配列Leu-Val-His-Gly-Lys-Leuをスペーサー配列として組み込むと、トリプシンシグナルとヒスチジン T a g の間の距離が離れ、酵素などによる切断に好都合である。

本発明のタンパク質発現ベクターは、また、「抗体認識エピトープ」をコードする核酸配列を含んでいてもよい。抗体認識エピトープとは、抗体によって認識される抗原決定部位のことであり、抗体と結合可能な部位を指す。抗体はモノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、抗血清等のいずれでもよい。エピトープを組換え融合タンパク質中に含有するように発現させた場合、当該エピトープに対する抗体を用いることにより組換え融合タンパク質の発現が確認でき、また、抗原-抗体アフィニティーカラムにより容易に単離、精製することができ、更にまた、任意に切断可能部位で切断することにより組換えタンパク質を得ることができる。エピトープとして発現させることができる例として、X p r e s s、チオレドキシン (Thioredoxin)、c-m y c、V 5、H A/c-m y c等を挙げることができる。

上記発現ベクターの宿主細胞に対する導入は、自体常套の方法で行われてよく、例えばリポポリアミン法、DEAE-デキストラン法、ハナハン法、リポフェクション法、リン酸カルシウム法によるトランスフェクション、マイクロインジェクション、エレクトロポレーション等の方法を採用することができる。

本発明には、上記構成のタンパク質発現ベクターに加え、当該タンパク質発現ベクターによって形質転換された宿主細胞、当該計質転換宿主細胞を培養して組換え融合タンパク質を発現させる組換え融合タンパク質の製造方法、当該製造方法によって得られる組換え融合タンパク質、当該組換え融合タンパク質から組換えタンパク質を生産する組換えタンパク質の製造方法、当該製造方法によって得られた組換えタンパク質も含まれる。

実施例

以下、実施例を挙げて本発明をさらに具体的に説明するが、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。ただし、以下の説明において、I g G k リーダーは、I g G の分泌シグナルと同義語であると理解されてよい。また、トリプシンシグナルは、それに近接してDDDDK (Asp-Asp-Asp-Asp-Lys) が存在する場合、当該DDDDKを含めてトリプシンシグナルと呼ぶ場合（配列番号19におけるアミノ酸番号1～23の配列）もあれば、当該DDDDKを含めずにトリプシンシグナルと呼ぶ場合（配列番号19におけるアミノ酸番号1～18の配列）もある。そのいずれを示すかは、前後の記載から当業者にとって容易に理解することができる。ただし、図1、3および5に示すトリプシンシグナルは、配列番号19のアミノ酸番号1～18である。なお、I g G k シグナルとトリプシンシグナルとは、相互に交換して使用できるものであり、その意味で両者は等価物であるということができ、ここで言うトリプシンシグナルは、DDDDKを含んでいるものまたは含んでいないもののいずれであつてもよい。

実施例1：プラスミドpTrypTag/ニューロシンの構築と発現

プラスミドpSecTag2A (Invitrogen社製) に、新たに組み込むヒスチジンTag (His tag) を含む分泌シグナル（以後、His 分泌シグナル）として、配列番号1に示す塩基配列を有するセンスDNAと、配列番号2に示す塩基配列を有するアンチセンスDNAを合成した。このHis 分泌シグナル配列の制限酵素切断部位の配列は、5' 末端はHindIII-NheIとし、3' 末端はBamHI-EcoRIとした。

プラスミドpSecTag2Aの1 μ g (0.1 μ l) を制限酵素NheIおよびBamHIで処理することにより、I g G k リーダー配列をコードする領域を完全に除去した。この溶液に対して、先のセンスDNAとアンチセンスDNAをそれぞれ100 pmol ずつ加え、70℃で10分間熱処理した後室温で30分間放置してアニーリングした。NheIとBamHIで処理したHis 分泌シグナル配列とpSecTag2A 1 μ l ずつにDNAライゲーションキットVer. 2 (宝酒造株式会社) のI液を2.0 μ l 加え、16℃で、30分間反

応させた。

反応液に大腸菌コンピテントセル X L 1 - B l u e (STRATAGENE社) 0.1 ml
1を加え、氷上で30分間反応させた後、42℃で、60秒間熱ショックを与え
た。2分間氷上に置いた後、SOC培地(東洋紡績株式会社)を0.9 ml加え、
5 37℃で、1時間シェーカーで振とう培養した。5,000 rpmで1分間遠心
分離して、上清を廃棄した。遠心管内に残った溶液で沈殿したコンピテントセル
を懸濁し、1:10の割合で2枚の100 μ g/mlのアンピシリンを含むアン
ピシリンLBプレートに播いた。37℃で、1晩培養し、生じたコロニーから得
られたプラスミドのうち、H i s分泌シグナルのDNAが挿入されているものを
10 PCRで選択し、それをp T r y p H i sとした。

Pharmacia Flex Prep kitを用いて昼夜培養した大腸菌よりp T r y p H i s
を回収した。5 μ gのp T r y p H i sベクターに対して20単位のB a m H I
を加え、37℃で4時間かけて切断した後、6単位のMung bean exonuclease
(宝酒造)を加えて室温(25℃)で30分間反応させて末端を平滑化した。更
15 に、20単位のE c o R Iでクローニングサイトの3'側を切断した後、1単位
のbacterial alkaline phosphatase(宝酒造)を加えて65℃で30分反応した。
挿入したヒトニューロシンcDNAは既にp S P O R T 1 (Gibco BRL)にクロ
ーン化されたcDNAを鋳型に配列番号3及び4で活性体に相当する部分をP C
Rによって増幅した。この際、配列番号3の5'末端はT4 polynucleotide
20 kinase(宝酒造)によってあらかじめリン酸化しておく。

得られたPCR産物は一度エタノール沈殿した後、3'末端をE c o R Iで切
断する。このcDNAと先ほどのp T r y p H i sを1.0%アガロースゲル電
気泳動によって分離して、目的のバンドを切り出し、Sephaglas BandPrep kit
(Pharmacia)によって精製した。これらを前述と同様にライゲートして大腸菌
25 X L 1 - B l u eを導入した。ニューロシンの配列を含むクローンを選別してp
T r y p H i s/ニューロシンとし(図1)、プラスミドDNAを回収した。1
 μ gのp T r y p H i s/ニューロシンをLipofectAMINE (Gibco BRL)を用いて
説明書に従ってCOS-1細胞に導入した。導入後48~72時間後に培養上清
及び細胞抽出液を回収して、定法に従って抗ニューロシン抗体(特願平10-1

87506号)を用いたウエスタン・ブロット解析を行ったところ、細胞抽出液にのみ組換えニューロシンが存在していた(図2)。

なお、ヒト活性型ニューロシンの核酸配列とアミノ酸配列は、配列番号14と15に示すとおりである。

5 実施例2 : pSecTag/ニューロシン、pSecHisTag/ニューロシン、pSecTrypHis/ニューロシンの作製と発現検討

(1) 各プラスミドの構築

10 pSecTag 2BクローニングサイトのHindIIIとXhoIサイトに配列番号5及び6でpTrypHis/ニューロシンを鋳型に増幅したニューロシンの活性領域のcDNAを実施例1と同様にして挿入し、pSecTag/ニューロシンとした(図3A)。pSecTag 2BのHindIIIとEcoRIサイトに実施例1で構築したpTrypHis/ニューロシンを鋳型に配列番号7及び4を用いて増幅したcDNAを挿入してpSecHisTag/ニューロシンとした(図3B)。実施例1と同様に配列番号8と9をアニールさせてNheIとBamHI消化したフラグメントをpSecTag 2Aに挿入し、pSecTrypHisとした。この平滑末端化したBamHIサイトとXhoIサイトに配列番号3と6とで増幅したニューロシン活性体を実施例1のごとく挿入し、pSecTrypHis/ニューロシンとした(図3C)。

15 なお、図3Bにおけるニューロシンの活性領域のcDNA (human active neurosin) より上流部分、すなわちIgGkリーダースペーサー配列-(His)6-DDDDKの部分の核酸配列とアミノ酸配列を、配列番号16と17に示す。IgGkリーダースペーサーはアミノ酸番号1～21までを示し、スペーサー配列はアミノ酸番号22～34までを示し、(His)6はアミノ酸番号35～40までを示し、DDDDKはアミノ酸番号41～45までを示す。

20 (2) 各プラスミドのCOS-1細胞での発現

25 各プラスミドDNA 1 µgを実施例1と同様の方法でCOS-1細胞に導入して48～72時間後に細胞抽出液と培養上清について、組換えニューロシンタンパク質の存在を抗ニューロシン抗体を用いたウエスタン・ブロット解析で検討した。その結果、いずれも培養上清中に分泌され、少なくともシグナルペプチ

ドとそのC末端側の数アミノ酸があれば細胞より分泌されることが示された。また、IgGkとトリプシノーゲンのシグナル配列を用いた場合とで分泌効率の差は認められなかった(図4)。

実施例3 : pFBTrypSigTag/ニューロシンの作製

5 配列番号10及び11によりpSecTrypHis/ニューロシンのトリプシンシグナルからエンテロキナーゼ認識サイトまでの部分にLeu-Val-His-GlyのペプチドがC末端にくるように増幅する。これをpSecTag2AのNheIとHindIIIサイトに挿入しプラスミドpTrypSigを作製した。pTrypHisのHis tag領域を含むおよそ200bpを配列番号11及び
10 7によって増幅し、HindIIIとBamHIによる消化で生じたHis tagとエンテロキナーゼ認識部位を含むおよそ40bpの断片をpTrypSigに挿入してpTrypSigTagを作製した(図5A)。

pTrypSigTagのトリプシンシグナル配列からエンテロキナーゼ認識部位までを配列番号6と12を用いたPCRによって作製したcDNAをBgl
15 IIIとBamHI消化によって切り出し、pFastBAC1(Gibco社製)のBamHIサイトに挿入した。挿入方向を配列番号6と13を用いたPCRによって確認し、polyhedrinプロモーターによって転写・翻訳される方向に挿入されたクローンを選択し、pFBTrypSigTagとした。これに実施例1と同様の方法でニューロシンの活性体を挿入して、pFBTrypSigTag/ニュー
20 ロシンとした(図5B)。この際、蛍光標識した配列番号10を用いて塩基配列を決定することにより、正しくニューロシンが挿入されているかを確認した。

なお、図5Bにおけるニューロシンの活性領域のcDNA(human active neurosin)より上流部分、すなわちトリプシンシグナル-DDDDK-スパーサー配列-(His)6-DDDDKの核酸配列とアミノ酸配列を、配列番号18
25 と19に示す。トリプシンシグナル-DDDDKはアミノ酸番号1~23までを示し、スパーサー配列はアミノ酸番号24~29までを示し、(His)6はアミノ酸番号30~35までを示し、それに続くDDDDKはアミノ酸番号36~40までを示す。

pFBTrypSigTag/ニューロシンをGibco BRL BAC-TO-BACバキュウ

ロウイルス発現系のプロトコールに従ってバクミドDNA上にトリプシノーゲンシグナルペプチド、His tag、及びエンテロキナーゼ認識部位を融合したキメラニューロシンを持つ組み換えバクミドを作製した。これをBAC-TO-BACバキュロウイルス発現系のマニュアルに従いSf-9細胞で発現させたところ、ウイルス感染後2日目より培養上清中に分泌されることが抗ニューロシン抗体を用いたウェスタン法によって確認された(図6)。

ウエスタンブロッティングは以下の方法を用いて行うことができる。すなわち、培養上清を回収後、等量の2×SDS loading buffer(第一化学社製)と混合し、沸騰浴中で5分間加熱したものをサンプル溶液とした。該サンプル溶液をSDS電気泳動装置(第一化学社製)およびSDS-tris-glycin buffer(第一化学社製)を用いて10~20%polyacrylamide gel(第一化学社製)で電気泳動した。一方、泳動中、ブロット用に3MM濾紙(Whatman社製)を陽極液1(第一化学社製)に2枚、陽極液2(第一化学社製)に1枚、陰極液(第一化学社製)に3枚浸した。また、polyvinylidene difluoride membrane(pvdf膜: Millipore社製)をメタノールに浸した後、精製水に浸し、水になじませた。

タンパク質のPVDF膜への転写は、電気泳動後、ゲルを装置から取り出し、ブロッター(ファルマシア社製)に陽極側からbuffer Aに浸した2枚の濾紙、buffer Bに浸した1枚の濾紙、PVDF膜、ゲルおよびbuffer Cに浸した3枚の濾紙を、この記載の順に置き、8mVで1.5時間で行った。転写後、PVDF膜をブロックエース(雪印乳業社製)で室温で1時間振とうすることでブロッキングした。その後、該膜を抗ニューロシン抗体を5%牛胎児血清添加PBSで希釈したものと4℃で一晩反応させた。その後、アルカリフォスファターゼ標識マウスIgG抗体を加え、室温で1時間反応後、NBT-BCIP溶液で発色させ、培養上清中、組換えニューロシンタンパク質の発現を確認した(図6)。

更に、この培養上清中に得られた組換え融合タンパク質(ニューロシン)をキレートカラムに通して精製し、透析後、酵素活性を測定した。まず、培養上清をPBSバッファーを用いてキレートカラム(Ni-NTA-Agarose、Qiagen社製)に供し、PBSにイミダゾールを溶解した溶液(和光純薬工業社製)で段階的(5、10、100、500mM)に溶出した。各分画を電気泳動し、ウエスタンブロット法

およびクーマシー染色で確認した（図7）。ウエスタンブロットは上記方法を用い、クーマシー染色は上記方法によって得られた電気泳動ゲルをクーマシーブリアントブルー染色液に10分間浸して染色した。その後、脱色液（水：酢酸：メタノール＝33：6：21）で脱色した。

- 5 得られた100mMイミダゾール溶出分画を、更にPD-10カラム（Pharmacia社製）でPBSバッファーに交換した。このサンプル50 μ lにエンテロキナーゼ（1U/ μ l、Invitrogen社製）10 μ lを混和し、室温で60分反応させた。次に合成基質Boc-Gln-Ala-Arg-MCA（ペプチド研究所）をDMSOに溶解し、1M Tris-HCl（pH8.0）で希釈した0.2M基質溶
- 10 液を50 μ l加え、更に、37℃で反応させた。経時的（1、2、4、5、15時間後）に励起波長380nm、蛍光波長460nmにおける蛍光を測定した（図8）。なお、図に示した値は、EKのみの蛍光値を差し引いた値を示している。

15 産業上の利用の可能性

- 本発明のタンパク質発現ベクターの特徴と利点は、当該タンパク質発現ベクターを上記した特定の構成となるように構築し、それによって目的タンパク質を成熟体または活性体として、容易に精製、取得できる点にある。当該タンパク質発現ベクターの好ましい構築例を挙げると、分泌シグナル核酸配列、その3'下流
- 20 に配置したTag核酸配列、その下流に配置したエンテロキナーゼが認識できるアミノ酸配列Asp-Asp-Asp-Asp-Lysをコードする核酸配列から成る切断可能核酸配列、その下流に続けて配置した目的タンパク質をコードする核酸配列およびさらに最下流に配置したストップコドンを含む核酸配列を有するものであって、これを使用することにより、目的タンパク質のN末端およびC末端に余分なアミノ
- 25 酸が付加しない組換えタンパク質、すなわち成熟型もしくは活性型の目的タンパク質を産生させることが可能である。

配列表フリーテキスト

SEQ ID NO: 1: Designed oligonucleotide to construct plasmid pTrypHis

5 SEQ ID NO: 2: Designed oligonucleotide to construct plasmid pTrypHis

SEQ ID NO: 3: Designed oligonucleotide primer to amplify neurosin-encoding sequence

SEQ ID NO: 4: Designed oligonucleotide primer to amplify neurosin-encoding sequence

10 SEQ ID NO: 5: Designed oligonucleotide primer to amplify a portion of plasmid pTrypHis/Neurosin

SEQ ID NO: 6: Designed oligonucleotide primer to amplify a portion of plasmid pTrypHis/Neurosin

15 SEQ ID NO: 7: Designed oligonucleotide primer to amplify a portion of plasmid pTrypHis/Neurosin

SEQ ID NO: 8: Designed oligonucleotide to construct plasmid pSecTrypHis

SEQ ID NO: 9: Designed oligonucleotide to construct plasmid pSecTrypHis

20 SEQ ID NO: 10: Designed oligonucleotide primer to amplify a portion of plasmid pSecTryp/Neurosin

SEQ ID NO: 11: Designed oligonucleotide primer to amplify a portion of plasmid pSecTryp/Neurosin

25 SEQ ID NO: 12: Designed oligonucleotide primer to amplify a portion of plasmid pTrypSigTag

SEQ ID NO: 13: Designed oligonucleotide primer to amplify a portion of plasmid pFBTrypSigTag

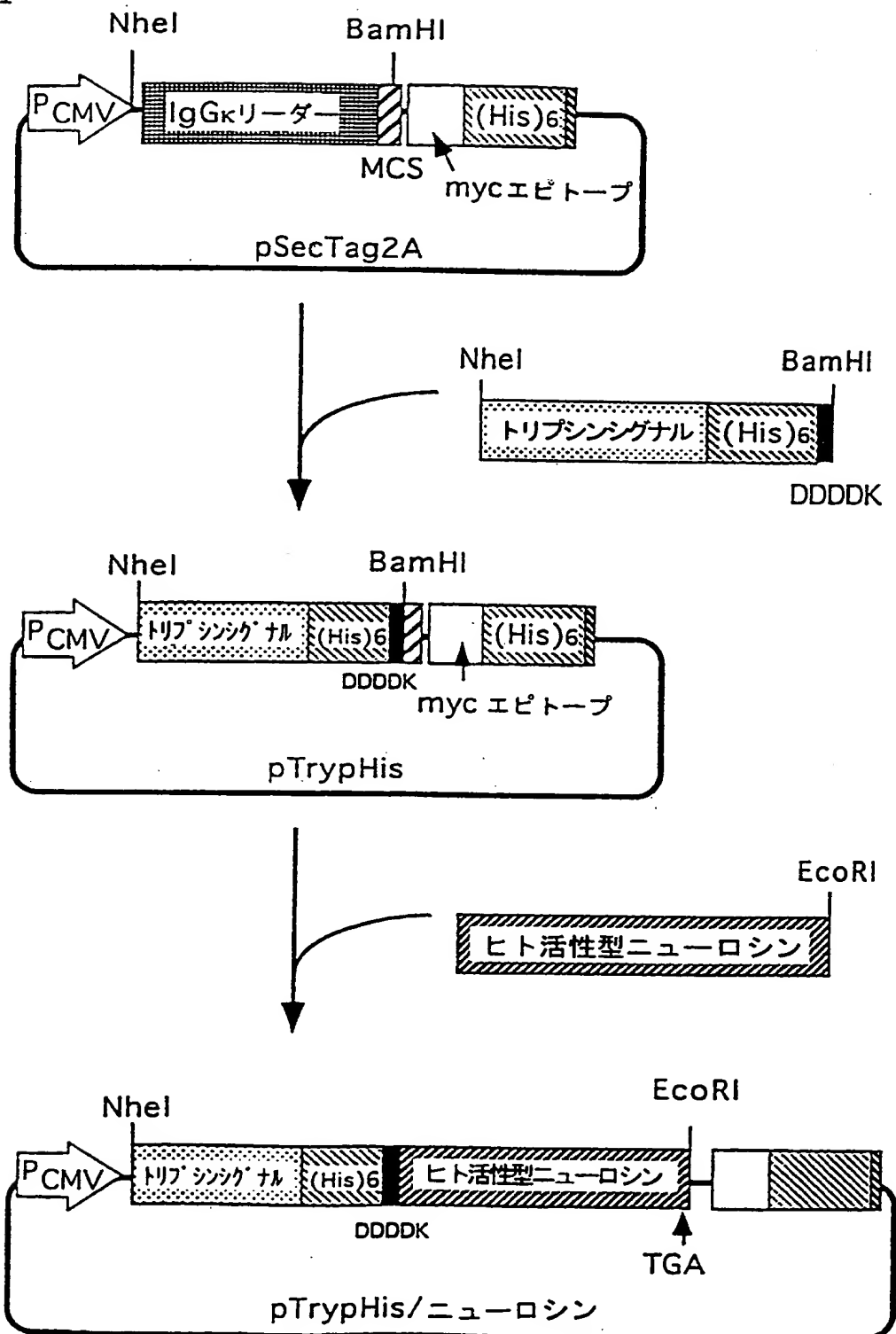
請 求 の 範 囲

1. 分泌シグナル核酸配列と、その3'下流側に、T a g 核酸配列、切断可能核酸配列および目的タンパク質をコードする核酸配列を挿入することができるクローニング部位をこの順序に含んでいることを特徴とする、タンパク質発現ベクター。
5
2. クローニング部位に、目的タンパク質をコードする核酸配列が挿入されている、請求項1記載のタンパク質発現ベクター。
3. クローニング部位または目的タンパク質をコードする核酸配列が、切断可能核酸配列の3'末端に連続して存在する、請求項1または2記載のタンパク質発現ベクター。
10
4. 分泌シグナル核酸配列の3'下流側であって、切断可能核酸配列の5'上流側に、少なくとも1個のアミノ酸をコードする核酸配列をスペーサー核酸配列として含んでいる、請求項1～3のいずれか1項記載のタンパク質発現ベクター。
5. スペーサー核酸配列が、少なくともLeu-Val-His-Gly-Lys-Leuなるアミノ酸配列をコードする核酸配列である、請求項4記載のタンパク質発現ベクター。
15
6. スペーサー核酸配列が、少なくとも切断可能核酸配列から構成されている、請求項4または5記載のタンパク質発現ベクター。
7. 切断可能核酸配列がアミノ酸配列に翻訳されたとき、当該アミノ酸配列の上流直近および／または下流直近および／または途中で酵素によって切断される、請求項1～6のいずれか1項記載のタンパク質発現ベクター。
20
8. 切断可能核酸配列が、少なくともAsp-Asp-Asp-Asp-Lysなるアミノ酸配列をコードする核酸配列である、請求項7記載のタンパク質発現ベクター。
9. 酵素がエンテロキナーゼである、請求項7または8記載のタンパク質発現ベクター。
25
10. 分泌シグナル核酸配列が、I g G (κ) シグナルまたはトリプシンシグナルである、請求項1～9のいずれか1項記載のタンパク質発現ベクター。
11. T a g 核酸配列がホリヒスチジンである、請求項1～10のいずれか1項記載のタンパク質発現ベクター。

- 1 2. さらに抗体認識エピトープをコードする核酸配列を含んでいる、請求項 1
～ 1 1 のいずれか 1 項記載のタンパク質発現ベクター。
- 1 3. 目的タンパク質をコードする核酸配列がニューロシンをコードするもので
ある、請求項 1 ～ 1 2 のいずれか 1 項記載のタンパク質発現ベクター。
- 5 1 4. 請求項 1 ～ 1 3 のいずれか 1 項記載のタンパク質発現ベクターで形質転換
された宿主細胞。
- 1 5. 宿主細胞が動物細胞である請求項 1 4 記載の宿主細胞。
- 1 6. 動物細胞が哺乳動物細胞である請求項 1 5 記載の宿主細胞。
- 1 7. 動物細胞が昆虫細胞である請求項 1 5 記載の宿主細胞。
- 10 1 8. 請求項 1 ～ 1 8 のいずれか 1 項記載のタンパク質発現ベクターまたは宿主
細胞を用いることを特徴とする、目的タンパク質の製造方法。
- 1 9. 請求項 1 8 記載の方法によって得られた、目的タンパク質。
- 2 0. 請求項 1 ～ 1 8 のいずれか 1 項記載のタンパク質発現ベクターまたは宿主
細胞を用いることを特徴とする、目的タンパク質のアミノ酸配列を含む組換え融
15 合タンパク質の製造方法。
- 2 1. 請求項 2 0 記載の方法によって得られた、目的タンパク質のアミノ酸配列
を含む組換え融合タンパク質。
- 2 2. 請求項 2 1 記載の組換え融合タンパク質を、当該組換え融合タンパク質中
の T a g および／またはエピトープを認識できる物質に保持させてから、脱離さ
20 せることにより精製し、ここに得られた精製組換え融合タンパク質を、当該組換
え融合タンパク質中の切断可能部位を認識することができる酵素を作用させて、
目的タンパク質を遊離させ、その後、この遊離した目的タンパク質を採取するこ
とを特徴とする、目的タンパク質の製造方法。
- 2 3. 請求項 2 1 記載の組換え融合タンパク質を、当該組換え融合タンパク質中
の T a g および／またはエピトープを認識できる物質に保持させてから、当該組
25 換え融合タンパク質中の切断可能部位を認識することができる酵素を作用させて、
目的タンパク質を遊離させ、その後、この遊離した目的タンパク質を採取するこ
とを特徴とする、目的タンパク質の製造方法。
- 2 4. 請求項 2 2 または 2 3 記載の方法によって得られた、目的タンパク質。

1/8

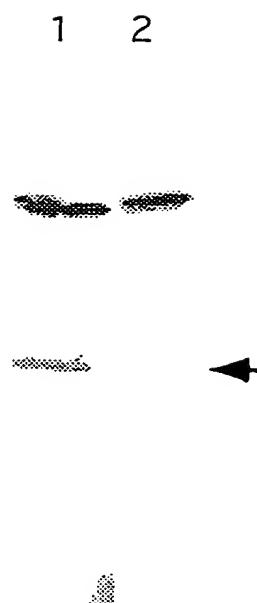
図 1



THIS PAGE BLANK (CUSTOM)

2/8

図 2

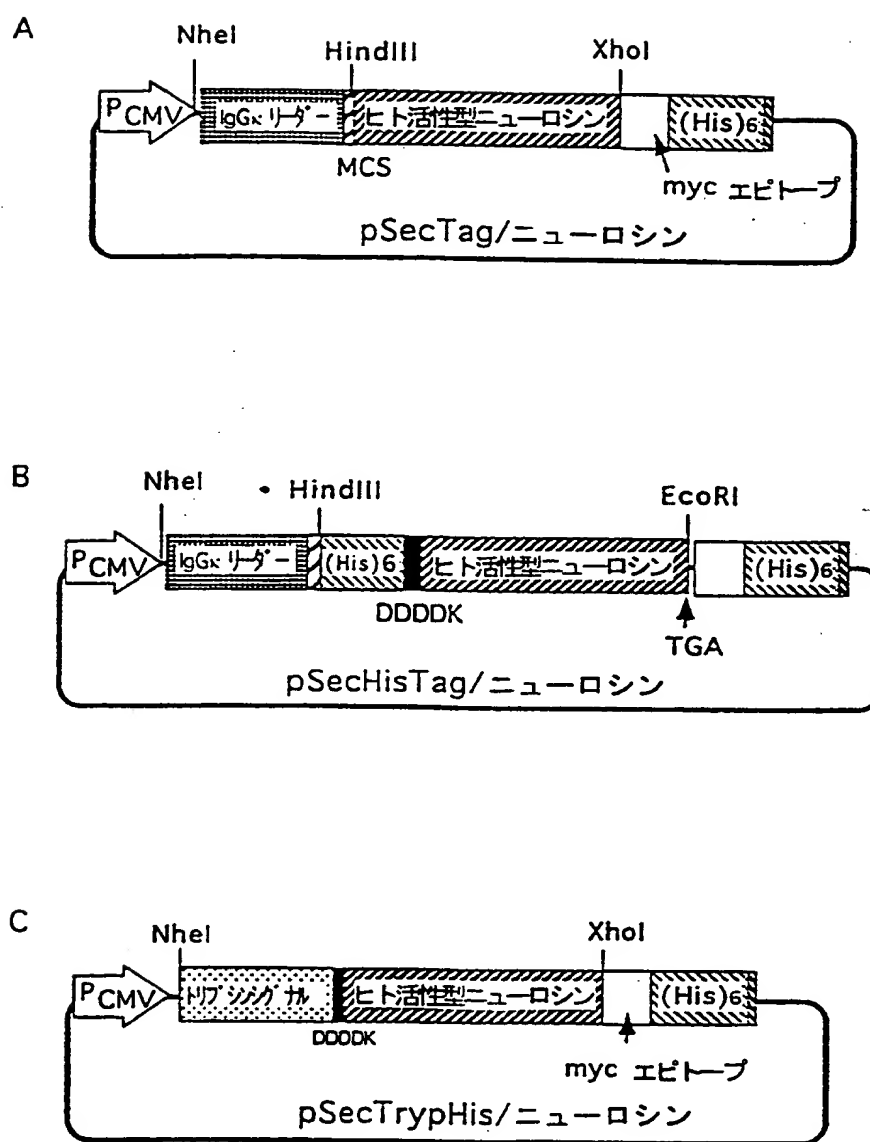


1; 細胞抽出液
2; 培養上清

THIS PAGE BLANK (USPTO)

3/8

図 3

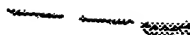


THIS PAGE BLANK (USPTO)

4/8

図 4

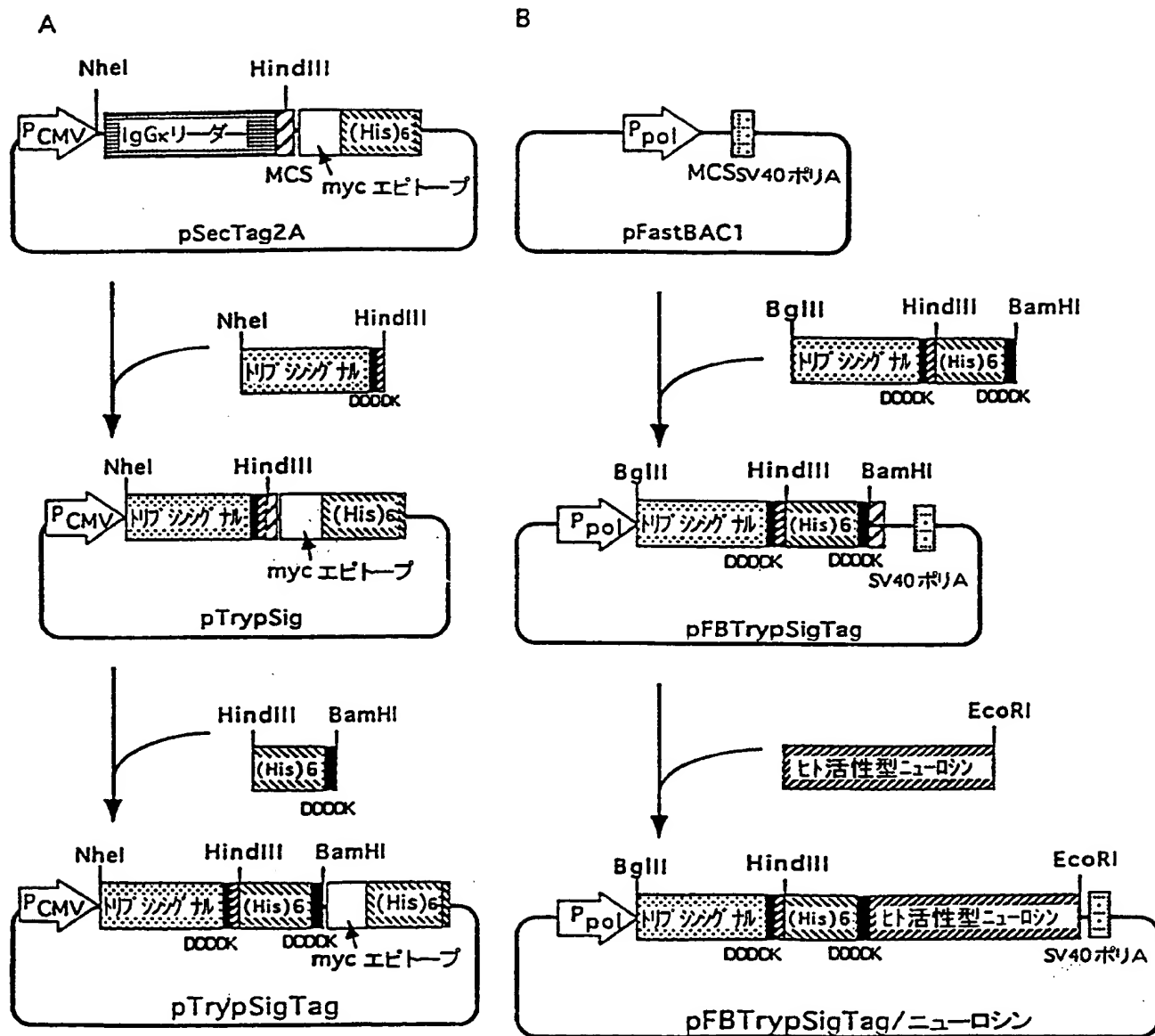
1 2 3



- 1; pSecTag/ニューロシン
- 2; pSecHisTag/ニューロシン
- 3; pSecTrypHis/ニューロシン

THIS PAGE BLANK (UST-10)

図 5



THIS PAGE BLANK (user)

6/8

図 6

1 2
—
.....

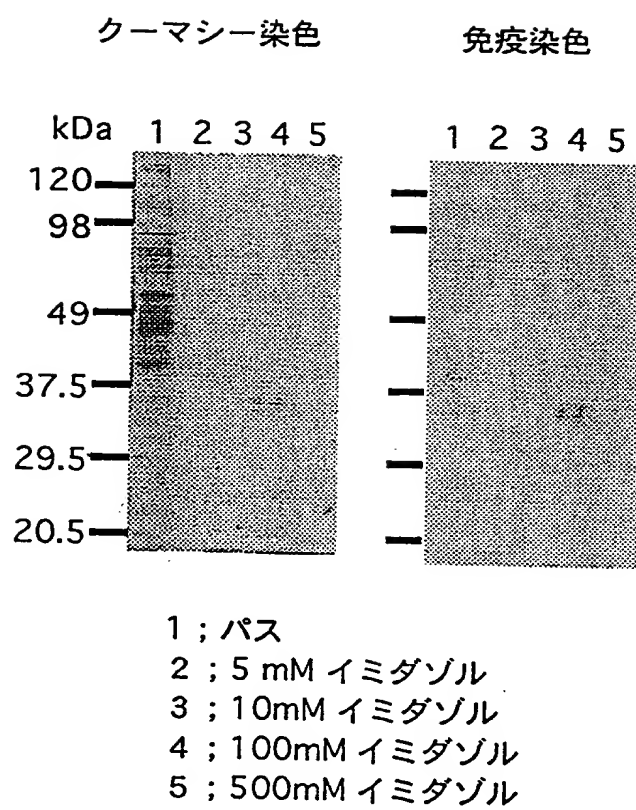


1; 培養上清
2; 細胞抽出液

THIS PAGE BLANK (USPFO)

7/8

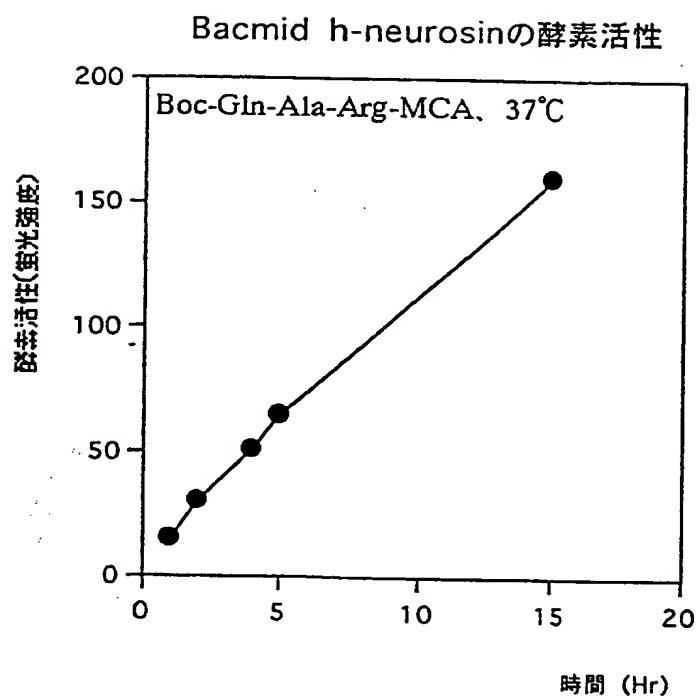
図 7



THIS PAGE BLANK (08/10)

8/8

図 8



THIS PAGE BLANK (COPY)

1/10

SEQUENCE LISTING

<110> Fuso Pharmaceutical Industries Ltd.

<120> Protein expression vector and use thereof

<130> 661637

<150> JP 10-331515

<151> 1998-11-20

<160> 19

<210> 1

<211> 117

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide to construct plasmid pTrypHis

<400> 1

aagcttggct agcaacacca tgaatctact cctgatcctt acctttgttg ctgctgctgt 60
tgctgcccc tttcaccatc accatcacca tgacgacgat gacaaggatc cgaattc 117

<210> 2

<211> 117

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide to construct plasmid pTrypHis

<400> 2

gaattcggat ccttgatcgc gtcgtcatgg tgatggatgat ggtgaaaggg ggcagcaaca 60

THIS PAGE BLANK (USPTO)

2/10

gcagcagcaa caaaggtaag gatcaggagt agattcatgg tggtgctagc caagctt 117

<210> 3

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify neurosin-encoding sequence

<400> 3

ttggtgcatg gcgga 15

<210> 4

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify neurosin-encoding sequence

<400> 4

ggaattcact tggcctgaat 20

<210> 5

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

12/13
PAGE BLANK (USPTO)

3/10

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify a portion of plasmid
pTrypHis/Neurosin

<400> 5

ctaagcttga cgacgatgac aagttg

26

<210> 6

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify a portion of plasmid
pTrypHis/Neurosin

<400> 6

tcctcgagac ttggcctgaa tggtttt

27

<210> 7

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify a portion of plasmid
pTrypHis/Neurosin

<400> 7

ccaagcttca ccatcaccat caccat

26

<210> 8

THIS PAGE BLANK (USPTO)

4/10

<211> 99

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide to construct plasmid pSecTrypHis

<400> 8

```
aagcttggct agcaacacca tgaatctact cctgatcctt acctttgttg ctgctgctgt 60
tgctgcccc tttgacgacg atgacaagga tccgaattc 99
```

<210> 9

<211> 99

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide to construct plasmid pSecTrypHis

<400> 9

```
gaattcggat ccttgctcatc gtcgtcaaag ggggcagcaa cagcagcagc aacaaaggta 60
aggatcagga gtagattcat ggtgttgcta gccaaagctt 99
```

<210> 10

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify a portion of plasmid pSecTrypHis/Neurosin

THIS PAGE BLANK (USPTO)

5/10

<400> 10

gcgctagcag atctccatga atctactcct gatcc

35

<210> 11

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify a portion of plasmid
pSecTrypHis/Neurosin

<400> 11

tgaagcttgc catggaccaa cttgtcatc

29

<210> 12

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify a portion of plasmid
pTrypSigTag

<400> 12

gcacagtcga ggctgat

17

<210> 13

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

THIS PAGE BLANK (08870)

6/10

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify a portion of plasmid
pFBTrypSigTag

<400> 13

caaatgtggt atggctg

17

<210> 14

<211> 672

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 14

ttg gtg cat ggc gga ccc tgc gac aag aca tct cac ccc tac caa gct	48
Leu Val His Gly Gly Pro Cys Asp Lys Thr Ser His Pro Tyr Gln Ala	
1 5 10 15	
gcc ctc tac acc tgc ggc cac ttg ctc tgt ggt ggg gtc ctt atc cat	96
Ala Leu Tyr Thr Ser Gly His Leu Leu Cys Gly Gly Val Leu Ile His	
20 25 30	
cca ctg tgg gtc ctc aca gct gcc cac tgc aaa aaa ccg aat ctt cag	144
Pro Leu Trp Val Leu Thr Ala Ala His Cys Lys Lys Pro Asn Leu Gln	
35 40 45	
gtc ttc ctg ggg aag cat aac ctt cgg caa agg gag agt tcc cag gag	192
Val Phe Leu Val Arg Ala Val Ile His Pro Asp Tyr Asp Ala Ala Ser	
50 55 60	
cag agt tct gtt gtc cgg gct gtg atc cac cct gac tat gat gcc gcc	240
His Asp Gln Asp Gly Lys His Asn Leu Arg Gln Arg Glu Ser Ser Gln	
65 70 75 80	
agc cat gac cag gac atc atg ctg ttg cgc ctg gca cgc cca gcc aaa	288

THIS PAGE BLANK (USPTO)

7/10

Glu Gln Ser Ser Val Ile Met Leu Leu Arg Leu Ala Arg Pro Ala Lys
 85 90 95
 ctc tct gaa ctc atc cag ccc ctt ccc ctg gag agg gac tgc tca gcc 336
 Leu Ser Glu Leu Ile Gln Pro Leu Pro Leu Glu Arg Asp Cys Ser Ala
 100 105 110
 aac acc acc agc tgc cac atc ctg ggc tgg ggc aag aca gca gat ggt 384
 Asn Thr Thr Ser Cys His Ile Leu Gly Trp Gly Lys Thr Ala Asp Gly
 115 120 125
 gat ttc cct gac acc atc cag tgt gca tac atc cac ctg gtg tcc cgt 432
 Asp Phe Pro Asp Thr Ile Gln Cys Ala Tyr Ile His Leu Val Ser Arg
 130 135 140
 gag gag tgt gag cat gcc tac cct ggc cag atc acc cag aac atg ttg 480
 Glu Glu Cys Glu His Ala Tyr Pro Gly Gln Ile Thr Gln Asn Met Leu
 145 150 155 160
 tgt gct ggg gat gag aag tac ggg aag gat tcc tgc cag ggt gat tct 528
 Cys Ala Gly Asp Glu Lys Tyr Gly Lys Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser
 165 170 175
 ggg ggt ccg ctg gta tgt gga gac cac ctc cga ggc ctt gtg tca tgg 576
 Gly Gly Pro Leu Val Cys Gly Asp His Leu Arg Gly Leu Val Ser Trp
 180 185 190
 ggt aac atc ccc tgt gga tca aag gag aag cca gga gtc tac acc aac 624
 Gly Asn Ile Pro Cys Gly Ser Lys Glu Lys Pro Gly Val Tyr Thr Asn
 195 200 205
 gtc tgc aga tac acg aac tgg atc caa aaa acc att cag gcc aag tga 672
 Val Cys Arg Tyr Thr Asn Trp Ile Gln Lys Thr Ile Gln Ala Lys ***
 210 215 220

<210> 15

<211> 223

THIS PAGE BLANK (USPTO)

8/10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 15

Leu Val His Gly Gly Pro Cys Asp Lys Thr Ser His Pro Tyr Gln Ala

1 5 10 15

Ala Leu Tyr Thr Ser Gly His Leu Leu Cys Gly Gly Val Leu Ile His

20 25 30

Pro Leu Trp Val Leu Thr Ala Ala His Cys Lys Lys Pro Asn Leu Gln

35 40 45

Val Phe Leu Val Arg Ala Val Ile His Pro Asp Tyr Asp Ala Ala Ser

50 55 60

His Asp Gln Asp Gly Lys His Asn Leu Arg Gln Arg Glu Ser Ser Gln

65 70 75 80

Glu Gln Ser Ser Val Ile Met Leu Leu Arg Leu Ala Arg Pro Ala Lys

85 90 95

Leu Ser Glu Leu Ile Gln Pro Leu Pro Leu Glu Arg Asp Cys Ser Ala

100 105 110

Asn Thr Thr Ser Cys His Ile Leu Gly Trp Gly Lys Thr Ala Asp Gly

115 120 125

Asp Phe Pro Asp Thr Ile Gln Cys Ala Tyr Ile His Leu Val Ser Arg

130 135 140

Glu Glu Cys Glu His Ala Tyr Pro Gly Gln Ile Thr Gln Asn Met Leu

145 150 155 160

Cys Ala Gly Asp Glu Lys Tyr Gly Lys Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser

165 170 175

Gly Gly Pro Leu Val Cys Gly Asp His Leu Arg Gly Leu Val Ser Trp

180 185 190

Gly Asn Ile Pro Cys Gly Ser Lys Glu Lys Pro Gly Val Tyr Thr Asn

THIS PAGE BLANK (USPTO)

9/10

195 200 205
 Val Cys Arg Tyr Thr Asn Trp Ile Gln Lys Thr Ile Gln Ala Lys ***
 210 215 220

<210> 16

<211> 135

<212> DNA

<400> 16

atg gag aca gac aca ctc ctg cta tgg gta ctg ctg ctc tgg gtt cca 48
 Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro
 1 5 10 15
 ggt tcc act ggt gac gcg gcc cag ccg gcc agg cgc gcg cgc cgt acg 96
 Gly Ser Thr Gly Asp Ala Ala Gln Pro Ala Arg Arg Ala Arg Arg Thr
 20 25 30
 aag ctt cac cat cac cat cac cat gac gac gat gac aag 135
 Lys Leu His His His His His His Asp Asp Asp Asp Lys
 35 40 45

<210> 17

<211> 45

<212> PRT

<400> 17

Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro
 1 5 10 15
 Gly Ser Thr Gly Asp Ala Ala Gln Pro Ala Arg Arg Ala Arg Arg Thr
 20 25 30
 Lys Leu His His His His His His Asp Asp Asp Asp Lys

THIS PAGE BLANK (USPTO)

10/10

35

40

45

<210> 18

<211> 120

<212> DNA

<400> 18

atg aat cta ctc ctg atc ctt acc ttt gtt gca gct gct gtt gct gcc 48

Met Asn Leu Leu Leu Ile Leu Thr Phe Val Ala Ala Ala Val Ala Ala

1

5

10

15

ccc ttt gat gat gat gac aag ttg gtg cat ggc aag ctt cac cat cac 96

Pro Phe Asp Asp Asp Asp Lys Leu Val His Gly Lys Leu His His His

20

25

30

cat cac cat gac gac gat gac aag

120

His His His Asp Asp Asp Asp Lys

35

40

<210> 19

<211> 40

<212> PRT

<400> 19

Met Asn Leu Leu Leu Ile Leu Thr Phe Val Ala Ala Ala Val Ala Ala

1

5

10

15

Pro Phe Asp Asp Asp Asp Lys Leu Val His Gly Lys Leu His His His

20

25

30

His His His Asp Asp Asp Asp Lys

35

40

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP99/06474

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
Int.Cl⁷ C12N15/86, C12N5/10, C12P21/02

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
Int.Cl⁷ C12N15/86, C12N5/10, C12P21/02

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
WPI, WPI/L, BIOSIS PREVIEWS, CAS ONLINE, GenBank/EMBL/DDBJ/Geneseq

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	Sabine K. et al., " The baculovirus expression vector pBSV-8His directs secretion of histidine-tagged proteins" Gene, Vol.162, (1995), p.225-229	1-40
Y	JP, 10-179169, A (Immuno Japan K.K.), 07 July, 1998 (07.07.98) (Family: none)	1-40

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

<p>* Special categories of cited documents:</p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p>	<p>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</p> <p>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art</p> <p>"&" document member of the same patent family</p>
--	---

Date of the actual completion of the international search
15 February, 2000 (15.02.00)

Date of mailing of the international search report
14 March, 2000 (14.03.00)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ C12N15/86, C12N5/10, C12P21/02

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ C12N15/86, C12N5/10, C12P21/02

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

WPI, WPI/L, BIOSIS PREVIEWS, CAS ONLINE, GenBank/EMBL/DDBJ/Geneseq

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	Sabine K. et al. "The baculovirus expression vector pBSV-8His directs secretion of histidine-tagged proteins" Gene 第162巻 (1995) p. 225-229	1-24
Y	JP, 10-179169, A (株式会社イムノ・ジャパン) 7.7月. 1998 (07.07.98) (ファミリーなし)	1-24

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

15.02.00

国際調査報告の発送日

14.03.00

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

加藤 浩

印

4B

9050

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

THIS PAGE BLANK (U&PTO)